

## Utilización del PECTIMORF y BIOBRAS-16 en la embriogénesis somática de la papa

Jaime R. Hidrobo Luna<sup>1\*</sup>, Eduardo Héctor Ardisana<sup>1</sup>, Juan Carlos Cabrera<sup>2</sup>, Isabel Jomarrón Rodiles<sup>3</sup>.

\*Autor para correspondencia.

<sup>1</sup> Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad Agraria de la Habana, Apartado 18-19, San José de las Lajas, CP 32 700. e-mail hidroboluna@yahoo.es

<sup>2</sup> Laboratorio de Oligosacarinas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana.

<sup>3</sup> Laboratorio de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de la Habana, Ciudad de la Habana, Cuba.

### RESUMEN

Con la aplicación del oligopeptato (PECTIMORF) y con un análogo de brasinoesteroides (BIOBRAS-16), se obtuvieron embriones somáticos, a partir de callos de 40 días de edad que fueron obtenidos de los entrenudos de plántulas de papa (*Solanum tuberosum*, L.) var. Desirée, micropropagadas *in vitro*. Se probaron estos biopreparados cubanos de producción comercial, como posibles sustitutos de los reguladores del crecimiento utilizados en los medios de cultivo para la inducción de embriones somáticos (MIE), compuestos por 10ml.l<sup>-1</sup> de sales de Murashige y Skoog, 0.1mg.l<sup>-1</sup> de ANA, 0.1mg.l<sup>-1</sup> de kinetina, 0.5mg.l<sup>-1</sup> de tiamina, 2.5mg.l<sup>-1</sup> de cisteína, 100mg.l<sup>-1</sup> de mioinositol, 20g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y 7.0g.l<sup>-1</sup> de agar. Se probaron cuatro medios de cultivo en distintas combinaciones, los cuales contenían cuatro concentraciones diferentes de PECTIMORF y BIOBRAS-16, como sustitutos de las auxinas y citoquininas. Al cabo de 90 días se obtuvieron resultados que determinaron, la posibilidad de sustituir a las auxinas (ANA 0.1mg.l<sup>-1</sup>) y a las citoquininas (kinetina 0.5mg.l<sup>-1</sup>) del medio de cultivo ya que la aplicación de PECTIMORF a una concentración de 3.2mg.l<sup>-1</sup> y BIOBRAS-16, a una concentración de 0.5mg.l<sup>-1</sup>, proporcionaron a los callos buena friabilidad, una masa fresca elevada (más de 1.4g) y una coloración parda al final del proceso, momento en el cual aparecieron los embriones somáticos en la superficie de los callos, en diferentes etapas de desarrollo.

Palabras clave: brasinoesteroides, callos, embrión somático, oligopeptato

### ABSTRACT

With the application of PECTIMORF and BIOBRAS-16, somatic embryos were obtained in potato (*Solanum tuberosum*, L) c.v. Desirée, of 40 days old callus obtained from stem micropropagated plants. These were used as possible substitutes for crop regulators used in culture media for the induction of somatic embryos. The culture media was composed for 10ml.l<sup>-1</sup> of Murashige and Skoog salt, 0.1mg.l<sup>-1</sup> ANA, 0.1mg.l<sup>-1</sup> kinetin, 0.5mg.l<sup>-1</sup> thiamine, 2.5mg.l<sup>-1</sup> cysteine, 100mg.l<sup>-1</sup> mioinositol, 20g.l<sup>-1</sup> sucrose and 2.0g.l<sup>-1</sup> agar. Four culture medias were tested in distinct combinations that contained different concentration of PECTIMOR and BIOBRAS-16 as substitute of auxins and cytokinins. After 90 days, the results obtained showed the possibility of substituting the auxins (0.5mg.l<sup>-1</sup> ANA) and the cytokinins (0.5mg.l<sup>-1</sup> kinetin) in the culture media, because the application of PECTIMORF at 3.2mg.l<sup>-1</sup> and BIOBRAS-16 at 1.0mg.l<sup>-1</sup>, gave friable callus, high fresh weight (more than 1.4g) and a brownish color at the end of the process, moment in which the somatic embryos of different phases, appeared at the surface of the callus.

Keywords: brasinoesteroids, callus, oligopeptate, somatic embryo

### INTRODUCCIÓN

Entre las técnicas de micropropagación de plantas se reconoce a la embriogénesis somática como la más eficiente por sus características, múltiples usos y optimización de todos los procesos involucrados en su desarrollo (Pérez,1998), su éxito se basa en una metodología experimental que ha incluido a la mayoría de cultivos con buenos resultados como la papa (*Solanum tuberosum*, L.).

Este proceso se ha visto complicado por los altos costos de reactivos, como los reguladores del crecimiento, tan necesarios en la elaboración de los medios de cultivo. El país se ha visto en la imperiosa necesidad de investigar la forma de sustituir estas sustancias con productos naturales que puedan ejercer la misma actividad que los productos sintéticos.

La utilización de biopreparados de producción comercial representan en la última década, una

alternativa para aumentar los rendimientos agrícolas, disminuir los costos de producción y hacer un mejor uso de productos naturales de fabricación nacional.

El PECTIMORF (Cabrera y Gutiérrez, 1995), es un biopreparado de origen cubano desarrollado por el Laboratorio de oligosacarinas del INCA, cuyo principio activo es una mezcla de oligosacáridos pépticos bioactivos. Estos compuestos han sido clasificados como oligosacarinas, que son moléculas señalizadoras derivadas de los polisacáridos que componen la pared celular de las plantas y que poseen en su constitución elementos auxínicos y citoquinínicos semejantes a aquellos de los reguladores del crecimiento artificiales. Ha sido probado en muchos cultivos con excelentes resultados y por sus características naturales se utiliza como un regulador del crecimiento. Lo mismo sucede con el BIOBRAS-16 (Jomarrón *et al.*, 2000), es una sustancia semi-sintética estimuladora del crecimiento vegetal que contiene como principio activo a un análogo de los brasinoesteroides. Fue sintetizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la Facultad de Química de la Universidad de la Habana, posee grandes posibilidades de sustitución de los reguladores del crecimiento tradicionales como las auxinas y citoquininas. Los brasinoesteroides son biopreparados de producción comercial, considerados reguladores del crecimiento de origen natural.

Estas dos sustancias han sido utilizadas en múltiples ocasiones *in vivo* (Núñez *et al.*, 1995b), pero últimamente se les utiliza *in vitro* (Díaz *et al.*, 1995; Núñez, 1999) como componentes principales de los medios de cultivo dentro de la micropropagación de algunas especies vegetales, pueden ejercer gran actividad estimuladora en el crecimiento vegetal, y a menor costo además

de poseer grandes posibilidades de desarrollar una industria nacional de biopreparados comerciales (Núñez *et al.*, 1995a; Núñez *et al.*, 1996).

Por todo esto se propone como objetivo de este trabajo:

Estudiar el efecto del PECTIMORF Y BIOBRAS-16 en el medio de cultivo utilizado para la inducción de embriogénesis somática de la papa, como posible vía para la sustitución de auxinas y citoquininas presentes en este medio de cultivo y la posterior maduración y germinación de los embriones somáticos obtenidos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

En el Laboratorio de Biotecnología Vegetal perteneciente a la Facultad de Agronomía de la Universidad Agraria de la Habana (UNAH), se obtuvieron callos embriogénicos a los 40 días de haber sido sembrados los entrenudos de vitroplantas de 30 días en un medio de cultivo para la inducción de callogénesis en la papa (MIC). Después de este tiempo, estos callos fueron colocados en cuatro medios de cultivo para inducción de embriogénesis somática (MIE<sub>1</sub>, MIE<sub>2</sub>, MIE<sub>3</sub>, MIE<sub>4</sub>), compuestos básicamente por sales de Murashige y Skoog (1962). Al medio de cultivo para inducir embriones somáticos 1 (MIE<sub>1</sub>) se suplementó con 0.1mg.l<sup>-1</sup> de ANA y se adicionó PECTIMORF en cuatro concentraciones diferentes en (mg.l<sup>-1</sup>): tratamiento 2 (3.2), 3 (3.4), 4 (4.3) y 5 (5.4) y un tratamiento control (1) sin PECTIMORF y al medio de cultivo para inducir embriones somáticos 2 (MIE<sub>2</sub>) se suplementó con 0.5mg.l<sup>-1</sup> de kinetina y se adicionaron las mismas cuatro concentraciones de PECTIMORF utilizadas en el medio de cultivo anterior y tomando al tratamiento seis como control (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos ensayados para la embriogénesis somática en papa utilizando PECTIMORF en diferentes concentraciones (en mg.l<sup>-1</sup>): tratamiento 7 (3.2), 8 (3.4), 9 (4.3) y 10 (5.4). (cantidades indicadas para un litro de medio de cultivo).

	MIE <sub>1</sub>					MIE <sub>2</sub>				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ANA	-	-	-	-	-	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg
KINETINA	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	-	-	-	-	-
PECTIMORF	-	3.2mg	3.4mg	4.3mg	5.4mg	-	3.2mg	3.4mg	4.3mg	5.4mg

A los dos medios de cultivo para inducir embriones somáticos siguientes 3 y 4 (MIE<sub>3</sub> y MIE<sub>4</sub>), al primero se le suplementó con 0.5mg.l<sup>-1</sup> kinetina y al otro con 0.1mg.l<sup>-1</sup> de ANA, respectivamente, se adicionó

a los dos medios, BIOBRAS-16 en cuatro concentraciones diferentes en (mg.l<sup>-1</sup>): tratamiento 7 (0.05), 8 (0.1), 9 (0.5) y 10 (1.0). Los tratamientos control fueron: (1) y (6), sin BIOBRAS-16 (Tabla 2).

Tabla 2. Tratamientos ensayados para la embriogénesis somática en papa utilizando BIOBRAS-16 en diferentes concentraciones (en mg.l<sup>-1</sup>): tratamiento 2 (0.05), 3 (0.1), 4 (0.5) y 5 (1.0). (cantidades indicadas para un litro de medio de cultivo).

	MIE <sub>3</sub>					MIE <sub>4</sub>				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ANA	-	-	-	-	-	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg	0.1mg
KINETINA	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	0.5mg	-	-	-	-	-
BIOBRAS-16	-	0.05g	0.1mg	0.5mg	1.0mg	-	0.05mg	0.1mg	0.5mg	1.0mg

Se realizaron 10 tratamientos para cada regulador del crecimiento con 15 repeticiones por tratamiento; los callos se incubaron a una temperatura de 25 ± 1°C bajo un fotoperíodo de 16 h luz.

Las variables evaluadas fueron:

-Masa Fresca final (MF) en (g)

-Cambio de coloración de los callos.(según escala de Santana,1995): nivel 1 (verde traslúcido), 2 (amarillo traslúcido), 3 (amarillo no – traslúcido), 4 (cremoso) y 5 (marrón y pardos).

-Textura de los callos (Santana, 1995): nivel 1 (indiferenciado), 2 (no-friable), 3 (poco friable), 4 (friable), 5 (muy friable).

-Consistencia de los callos (Santana, 1995): nivel 1(indiferenciado), 2 (esponjoso), 3 (poco compacto), 4 (compacto), 5 (compacto).

-Momento de aparición de los embriones (días).

-Cantidad de embriones somáticos.

Estas evaluaciones se realizaron al final del experimento que culminó a los 130 días de sembrados los explantes iniciales, momento en el que aparecieron los embriones somáticos en la superficie de los callos.

Los resultados se procesaron estadísticamente a través de un análisis de varianza de clasificación simple, con un diseño completamente aleatorizado, las medias estadísticas se compararon a través de la prueba de Duncan para el 0.05% de significación, para esto se utilizó el programa STATGRAPHICS versión 3.1 para Windons. Las figuras y base de datos se realizaron con el programa EXCEL. Por último se realizó una evaluación económica basada en la información de la tabla 3.

Tabla 3. Comparación de los gastos incurridos en la preparación de un litro de medio de cultivo para la inducción de embriogénesis somática en papa, utilizando reguladores del crecimiento, PECTIMORF y BIOBRAS-16.

Producto	Concentración (mg.l <sup>-1</sup> )	Costo /litro de medio de cultivo	
		USD	Pesos Cubanos
ANA	0.1	0.10	-
KINETINA	0.5	0.09	-
PECTIMORF	3.2	-	0.12
	3.4	-	0.15
	4.3	-	0.17
	5.4	-	0.21
	5.4	-	0.21
BIOBRAS-16	0.05	-	0.01
	0.1	-	0.02
	0.5	-	0.10
	1.0	-	0.20

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1, se pueden observar los resultados obtenidos en los distintos tratamientos realizados en los medios de cultivo 1 y 2 para inducción de embriogénesis somática (MIE<sub>1</sub> y MIE<sub>2</sub>).

Los mayores valores de masa fresca en los callos en el medio de cultivo 1 (MIE<sub>1</sub>), se encontraron en el tratamiento 2 con el PECTIMORF a una

concentración de 3.2mg.l<sup>-1</sup> sin auxinas (2 al 5). Estos callos poseían buenas características de consistencia y textura, según la escala de Santana (1995), utilizada para el estudio de la embriogénesis somática del caféto (*Coffea sp.*), fueron de 3-4; la coloración de los callos en este medio fue cremosa y traslúcidos (cuatro según la misma escala) y en la mayoría de éstos no aparecieron embriones somáticos. Resultados similares fueron descritos por Montes *et al.* (2000), en el *Anthurium cubense*.

Los tratamientos correspondientes al control (seis) y al tratamiento (siete) con  $3.2\text{mg.l}^{-1}$  de PECTIMORF perteneciente al medio de cultivo dos ( $\text{MIE}_2$ ), mostraron mejores resultados que aquellos donde se utilizó PECTIMORF más ANA, éstos fueron significativamente diferentes entre sí, siendo los callos del tratamiento (siete) con  $3.2\text{mg.l}^{-1}$  más kinetina los que mejores características morfológicas y embriogénicas mostraron según los máximos niveles alcanzados utilizando la escala de Santana (1995), ya que además de ser estos callos los que alcanzaron valores promedio de masa fresca superior a  $1.0\text{g}$ , su consistencia compacta y su textura fue totalmente friable, alcanzando el valor cinco según la escala de Santana (1995), estas características determinan la viabilidad embriogénica de los callos.

Su coloración fue marrón y con algunas zonas blanquecinas (nivel cinco, según Santana, 1995), lugares en los cuales hicieron su aparición los embriones somáticos, redondeados y blancos,

totalmente diferenciados del resto de tejido materno. El número de embriones somáticos obtenidos en este tratamiento fue de 40, los mismos se encontraban en diferentes etapas de desarrollo (debido a la asincronía celular, característica de este proceso), destacándose los globulares, que en algunos casos formaron pequeños grupos debido a la reactivación de sus paredes celulares. Esta última característica fue reportada por Hernández *et al.* (1999) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum*, L.).

Estos resultados sugieren que al sustituir las citoquininas del medio de cultivo con el PECTIMORF a la concentración  $3.2\text{mg.l}^{-1}$  se logra un balance en el medio de cultivo con las auxinas. Además se puede observar que existieron diferencias estadísticas significativas entre estos resultados al compararlos con los demás tratamientos realizados. Cevallos (2000), quien trabajó en el cultivo del cafeto (*Coffea canephora*) encontró algunos resultados equivalentes con los de este trabajo utilizando concentraciones similares.

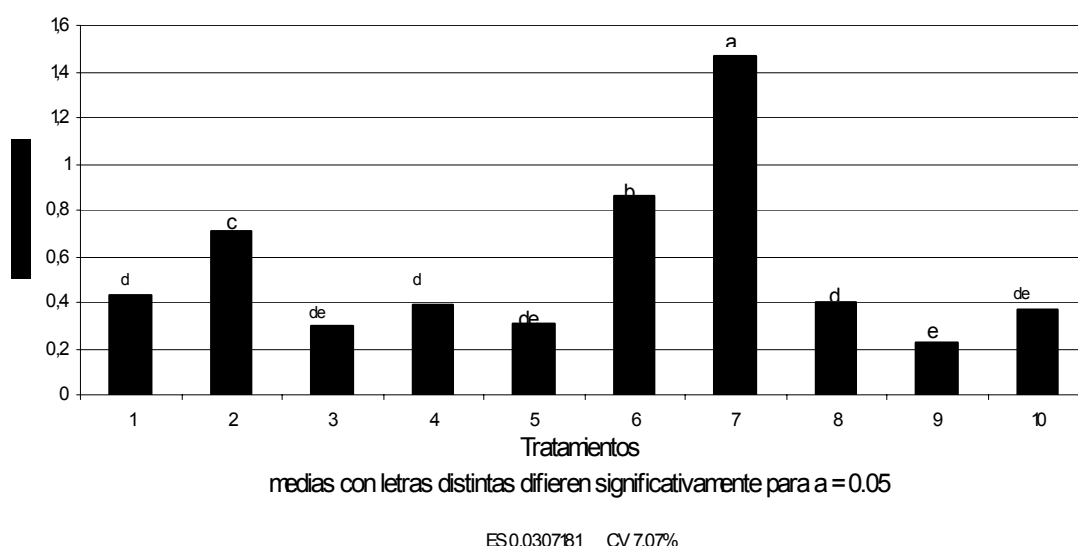


Figura 1. Tratamientos ensayados para la embriogénesis somática en papa adicionando PECTIMORF en diferentes concentraciones. Tratamiento 1 y 6 (control), 2 y 7 ( $3.2$ ), 3 y 8 ( $3.4$ ), 4 y 9 ( $4.3$ ), 5 y 10 ( $5.4\text{mg.l}^{-1}$ ) (cantidades indicadas para un litro de medio)

Los resultados obtenidos al utilizar el BIOBRAS-16, en diferentes concentraciones, se pueden observar en la figura 2, encontrándose diferencias estadísticas significativas entre los distintos tratamientos. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se empleó  $0.5\text{mg.l}^{-1}$  de BIOBRAS-16 combinado con  $0.5\text{mg.l}^{-1}$  de kinetina. Los callos en este tratamiento poseían una masa fresca de más de  $0.6\text{g}$ , eran poco traslúcidos y tenían un color cremoso, (nivel cuatro según la escala de Santana, 1995) con excelentes características de consistencia y textura (nivel cinco de la misma escala). Lo más notable en este período fue la aparición de los embriones somáticos en la superficie de los

callos, los cuales se encontraban en diferentes etapas de desarrollo destacándose los globulares. García *et al.* (2000), trabajando en el cultivo del cafeto (*Coffea canephora*), obtuvo embriones somáticos en distintas etapas de desarrollo, destacándose los globulares y torpedo.

Se pudo observar además que el tratamiento dos, que contenía  $0.01\text{mg.l}^{-1}$  de BIOBRAS-16 produjo mayor masa fresca que el control (uno) pero esta producción fue inferior al tratamiento (cuatro) con  $0.5\text{mg.l}^{-1}$  de BIOBRAS-16. Los callos en este tratamiento (cuatro) llegaron a tener una masa fresca de  $0.65\text{g}$ .

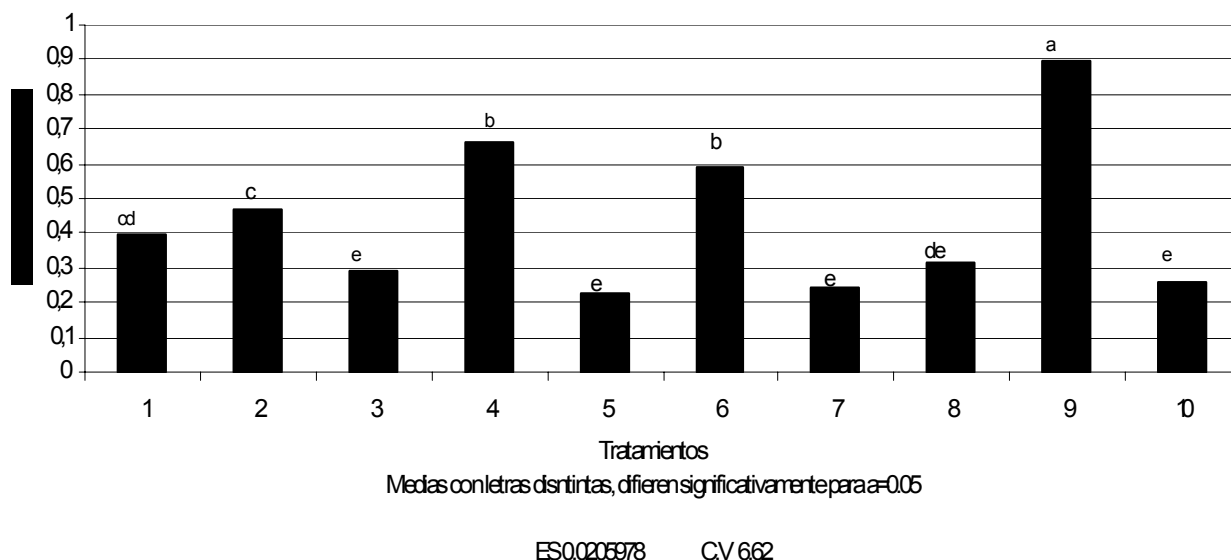


Figura 2. Tratamientos ensayados para la embriogénesis utilizando BIOBRAS-16 en diferentes concentraciones. 1.6 (control), 2 y 7 (0.05), 3 y 8 (0.1), 4 y 9 (0.5) y 5 y 10 (1.0mg.l<sup>-1</sup>) (cantidades indicadas para un litro de medio de cultivo)

Asimismo se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos donde se combinó el BIOBRAS-16 con las auxinas; es destacable también las diferencias significativas obtenidas entre los distintos tratamientos. El mayor valor de masa fresca (0.9g) se obtuvo cuando se empleó 0.5mg.l<sup>-1</sup> de BIOBRAS-16. Los callos que no poseían buenas características al utilizar estos biopreparados, no se les consideró indeseables si no que fueron utilizados para continuar con los estudios siguientes. Los resultados obtenidos fueron equivalentes a los encontrados por García *et al.* (1997) en el cultivo del cafeto (*Coffea canephora*) y por Hernández *et al.* (1999) en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) pero sin el empleo de biopreparados, lo que nos permite realizar la valoración económica que al utilizar estas sustancias que han sido adquiridas en moneda

nacional se pueden obtener resultados semejantes que utilizando reguladores del crecimiento sintéticos pero a menos valor. Los callos poseían excelentes características de consistencia y friabilidad y según la escala de Santana (1995) alcanzaron el nivel cinco, el color de los mismos fue marrón y poco traslúcidos.

Esto sucedió a los 130 días de sembrados los explantes iniciales en los medios de cultivo tres y cuatro para inducción de embriones somáticos (MIE<sub>3</sub> MIE<sub>4</sub>), momento en el cual aparecieron los embriones somáticos en la superficie de los callos. Estos eran totalmente diferenciados del resto de los callos, blanquecinos y en diferentes etapas, siendo los más frecuentes los embriones en estado globular. Resultados similares fueron encontrados por García *et al.* (1998). (Figura 3).

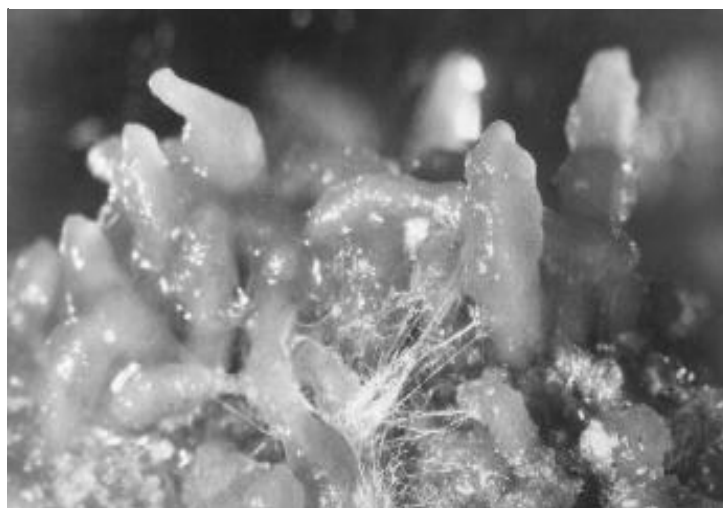


Figura 3. Embriones somáticos en la superficie de los callos de papa a los 130 días de sembrado el explante inicial



Se comprobó además que el medio de cultivo tuvo gran influencia en los resultados alcanzados ya que el que no posee kinetina en su composición, al adicionar BIOBRAS-16 a una concentración de 0.5mg.l<sup>-1</sup> al parecer se efectuó un balance entre este biopreparado que poseería estructuras similares a la de las citoquininas con el ANA, presente en el medio de cultivo.

## CONCLUSIONES

Se puede concluir diciendo que es posible ahorrar divisas al utilizar el PECTIMORF, el cual produjo sus mejores resultados a una concentración de 3.2mg.l<sup>-1</sup>, en el medio de cultivo con auxinas y sin citoquininas y el BIOBRAS-16 el cual alcanzó sus mejores promedios de masa fresca a una concentración de 0.5mg.l<sup>-1</sup> en el medio de cultivo con auxinas y sin citoquininas. Además, los dos tratamientos fueron eficaces en la obtención de embriones somáticos de papa lo que ocurrió a los 130 días de haber sido sembrado los explantes iniciales.

## REFERENCIAS

- Cabrera J C y Gutiérrez AC (1995) Preparation of Peptic Hydrolysates from Cuban commercial pectin. *Cultivos Tropicales*. (16)2: 30-34
- Cevallos AM (2000) Proceso de Embriogénesis somática en *Coffea canephora*, var. Robusta (Tesis de Doctorado). INCA, San José de las Lajas. 235p.
- Díaz G, Pérez N, Núñez M y Torres W (1995) Efecto de un análogo de Brasinoesteroides DDA-6 en el cultivo de *Nicotiana tabacum*, L. *Cultivos Tropicales*. 16(3): 53-55
- García D, Marrero M, Cuba y Núñez M (1997). Efecto cualitativo de análogos de Brasinoesteroides como sustitutos hormonales en la calogénesis de *Coffea canephora*, var. Robusta. *Cultivos Tropicales*. 18(2): 8-10
- García D, Torres W, Cuba M y Núñez M (1998) Análisis del crecimiento de callos de *Coffea canephora* var. Robusta en presencia del análogo de brasinoesteroides MH5. *Cultivos Tropicales*. 19(3):55-60
- García D (2000) Acción del análogo de brasinoesteroides MH5 y la kinetina en la formación de biomasa en callos de *Coffea canephora* var. Robusta. *Cultivos Tropicales*. 21(3): 39-45
- Hernández M, Moré O y Núñez M (1999) Empleo de análogos de brasinoesteroides en el cultivo *in vitro* de *Solanum tuberosum*, L, var. Desirée. *Cultivos Tropicales*. 20(4): 35-39
- Jomarrón I; Coll F; Robaina C; Alonso E; Cabrera MT. (2000). Polyhidroxispirostenones as plant growth regulators. *European Patent bulletin*. Number 2000/29
- Montes S, Aldaz JP, Cevallos M, Cabrera JC y López M (2000) Uso del bioregulator PECTIMORF en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*. 21(3): 29-31
- Núñez M, Torres W y Coll F (1995a) Effectiveness of a synthetic brassinosteroid on potato and tomato yields. *Cultivos tropicales*. 16(1): 26-27
- Núñez M, Domingos JP, Torres W, Coll F, Alonso E y Benítez B (1995b) Influencia del análogo de brasinoesteroide Biobras-6 en el rendimiento de plantas de tomate. *Cultivos Tropicales*. 16(3): 49-52
- Núñez M, Torres W y Echeverría I (1996) Influencia de un análogo de brasinoesteroide en el crecimiento y actividad metabólica de plantas jóvenes de tomate. 17(3):26-30
- Núñez M (1999) Aplicaciones prácticas de los brasinoesteroides y sus análogos en la agricultura. *Cultivos Tropicales*. 20(3): 63-72
- Santana N (1995) Embriogénesis somática en el café. En: González MC (Ed) La biotecnología en Cuba, pp. 39-58. CNIC, Ciudad Habana